

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200426048

UDC_____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

悬浮培养大豆细胞高产植物雌激素
成分的研究

**The Research of High Productivity of Phytoestrogens
Components in Suspended Culture Soybean Cells**

梁晓芳

指导教师姓名: 朱学艺 副 教 授

专 业 名 称: 发 育 生 物 学

论文提交日期: 2007 年 6 月 29 日

论文答辩时间: 2007 年 7 月 21 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 田惠桥

评 阅 人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保留的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应的括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

目 录

摘要.....	1
Abstract.....	3
前言.....	5
1 植物雌激素的研究概述.....	5
2 植物组织培养和悬浮培养的研究.....	11
3 本论文的研究内容和意义.....	14
第一章 大豆愈伤组织诱导和悬浮培养细胞系的建立.....	16
1 材料与方法.....	16
2 结果分析.....	19
3 讨论.....	30
第二章 前体和诱导子对悬浮培养细胞中异黄酮积累的影响.....	33
1 材料与方法.....	33
2 结果分析.....	35
3 讨论.....	45
总结.....	49
参考文献.....	50
缩写词.....	60
致谢.....	61

Catalogue

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	3
Preface.....	5
1 The study of phytoestrogens.....	5
2 The study of soybean tissue culture and suspension culture.....	11
3 The meaning and content of this research.....	14
I Soybean callus induction and suspended cell line established.....	16
1 Materials and methods.....	16
2 Results.....	19
3 Discussion.....	30
II The effect of precursor and elicitors on the accumulation of isoflavones in suspended culture cells.....	33
1 Materials and methods.....	33
2 Results.....	35
3 Discussion.....	45
Conclusion.....	49
Reference.....	50
Abbreviations.....	60
Acknowledgement.....	61

摘 要

更年期的妇女, 由于卵巢功能减弱, 雌激素分泌不足, 容易导致骨质疏松、心血管疾病等更年期综合症的发生。采用雌激素替代疗法可以缓解更年期综合症, 雌激素通过调节平滑肌张力和脂代谢降低心血管疾病的发生, 对心血管系统有保护作用。然而, 长期使用动物雌激素有较大的副作用, 会增加患子宫内膜癌、乳腺癌的风险。近年来研究发现异黄酮等植物次生代谢物具有与雌二醇相类似的结构, 能够与雌激素受体结合, 表现出雌激素样作用, 这类物质称为植物雌激素。和动物雌激素(主要为雌二醇)相比, 植物雌激素对血管壁和生殖器官上的雌激素受体具有不同的选择性结合能力, 所以对生殖系统的副作用较小, 不但能够缓解妇女更年期综合症, 而且会减少子宫内膜癌和乳腺癌的发病几率。这一领域的研究为人类寻觅有效而安全的雌激素替代天然药物提供了新的线索和思路。异黄酮类物质大量存在于豆科植物及其产品中, 但利用栽培资源植物提取该成分不仅需要占用大量耕地、植物生长周期较长, 而且还要受地域和气候等多种环境因素的限制。利用植物细胞培养技术来生产植物代谢产物则可以克服上述限制, 为人类获得天然物质提供一条新途径。

本文运用组织培养技术, 诱导了大豆愈伤组织, 并建立了大豆悬浮细胞培养体系, 从悬浮细胞中提取大豆异黄酮, 有利于扩大植物雌激素的来源。同时我们研究了异黄酮合成前体物苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)、次生物质有效诱导子茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)及蔗糖(Sucrose, S)和二甲亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO)对大豆悬浮细胞中异黄酮积累的影响。主要包括以下几个方面:

1. 大豆种子经消毒后, 在培养基上萌发并长出无菌苗, 取其下胚轴为外植体诱导愈伤组织。诱导条件为: MS+2,4-D 0.8mg/L+琼脂 0.8%, 暗中培养, 温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。可在 15 天诱导出愈伤组织, 白色或淡黄色, 继代培养后, 建立了悬浮细胞系; 以子叶为外植体, 诱导愈伤组织, 诱导条件为: MS+2,4-D 5.0mg/L +琼脂 0.8%, 暗中培养, 温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 可在第 5 天诱导出愈伤组织, 块大、细胞松散、白色或淡黄色, 继代培养后, 可建立悬浮细胞系。
2. 培养基中加入 BA 不利于子叶愈伤组织的形成; 以下胚轴诱导愈伤时, BA 的存在导致愈伤组织坚硬, 细胞致密, 不利于形成悬浮细胞。
3. 以每克干重计算, 愈伤组织和悬浮细胞中的异黄酮含量均高于种子中。种子

中总异黄酮含量为: 1.55 mg/g, 悬浮细胞中总异黄酮含量为 4.88mg/g, 是种子的 3.15 倍。

4. 经筛选确定: 有利于大豆悬浮细胞中总异黄酮积累的最佳培养条件为: MS+2,4-D 0.8mg/L, 暗培养, 转速 120r/min。

5. 在对数生长期末期(第 6 天)加入 DMSO, 48h 后收获细胞, 有利于总异黄酮的积累, 含量为 7.54mg/g, 是对照悬浮细胞总异黄酮含量的 1.6 倍, 是种子总异黄酮含量的 4.9 倍; 获取大豆素的最佳培养条件为: 45g/L 蔗糖作用于大豆素悬浮细胞 72h; 大豆悬浮细胞中加入 10umol/L 的苯丙氨酸不仅有利于大豆素积累, 而且对染料木素的积累有一定作用, 48h 时处理组表现为对照的 120%; 茉莉酸甲酯在 24h 内有利于大豆悬浮细胞中总异黄酮的积累, 随时间延长, 则抑制细胞的生长, 且易导致细胞褐化死亡。

关键词: 植物雌激素, 大豆(*Glycine max*), 悬浮培养细胞

Abstract

Menopause women are easy to sicken for kinds of syndromes such as osteoporosis and blood vessel disease because of weakened ovary function and estrogen's insufficiency. Estrogen replacement therapy can mitigate the Menopause syndrome. Although estrogen can protect cardiovascular system by reducing the rate of cardio-vascular disease through regulating smooth muscle strain and lipid metabolize, there is great side effect showing the risk of endometrial cancer and breast cancer occurrence increased after taking estrogen for a long time. Phytoestrogens such as isoflavones, which originates from plant and has similar structure to mammalian estrogens, can weakly bind to estrogen receptors and show either estrogen-like effects or anti-estrogenic effects on the target tissues. They can selectively bind to estrogen receptor ($ER\alpha$ and β), inhibit the occurrence of endometrial cancer and breast cancer while mitigating the menopause syndrome. Research in this area for mankind to find effective and safe natural estrogen replacement drugs provided new clues and ideas. Isoflavones are existed in large amounts in soybeans, however, the use of planting resources as a phytoestrogens source not only need a large amount of farmland, but also have a longer period of plant growth cycle. Besides it also affected by geography, climate and other environmental factors. The use of plant cell culture technology to the production of plant metabolites can overcome these constraints and provide Human a new way to access to natural substances.

In the present study, soybean callus was induced and cell suspension cultured line was established to expand the sources of phytoestrogens. Meanwhile, we studied the impacts of isoflavones synthesis precursor phenylalanine (Phenylalanine, Phe), secondary material effective elicitor methyl jasmonate (methyl jasmonate, MJ), sucrose (Sucrose, S) and DMSO (Dimethylsulfoxide, DMSO) on the isoflavones accumulation in soybean suspension cells. Main conclusions are as follow:

1. Soybean seeds, after disinfection, germinated and grew on medium without bacteria in order to obtain seedling from which the hypocotyls were induced into callus.

Induction conditions: MS +2,4-D 0.8mg/L+ agar 0.8%, cultured in the dark with temperature $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Callus, white or light yellow, was induced in 15 days. Suspended cells system was established. Cotyledon explants from the seedling also was induced into callus. Induction conditions: MS +2,4-D 5.0mg/L+ sucrose3% + agar 0.8%; cultured in the dark with temperature $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Callus with white , light yellow , big or loose ,was induced in 5 days. Following the culture, we can also establish suspended cell lines.

2. BA is not conducive to the formation of cotyledon callus; With its presence, the hypocotyl callus was induced with compact cells and rigidity tissues and not conducive to the formation of cell suspension.

3. The isoflavones content of callus and suspension cells is higher than seeds. Total isoflavones content of suspended cells is approximately 4.88 mg/g, which is 3.15 times as that in the seeds.

4. The optimal conditions of isoflavones accumulation in soybean suspended culture cells: MS +2,4-D 0.8mg/L+ agar 0.8%, cultured in the dark with temperature $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ and rotated speed 120r/min.

5. DMSO can strongly stimulate the synthesis of isoflavones which can reach 7.54 mg/g at 48h. This content is 1.6 times as that in the cell suspension and 4.9 times in seeds; 45g/L sucrose is good for the accumulation of daidzein; 10umol/L Phe is conducive not only to daidzein accumulation but also to genistein accumulation at 48h. The content of genistein in regulated groups is 120% as that in control groups; 5umol/L MJ can promote soybean suspension cell to death and be not conducive to the synthesis of isoflavones.

Key words: Phytoestrogens, Soybean(*Glycine max*), suspended culture cells

前 言

更年期妇女由于卵巢功能衰退, 雌激素分泌不足, 产生骨质疏松、心血管疾病等更年期综合症的现象十分普遍。大量研究表明, 应用雌激素替代治疗 (estrogen replacement therapy, ERT) 可明显减轻更年期妇女的绝经症状、预防骨质疏松和降低心血管疾病的发病率。但临床研究结果显示, 长期应用雌激素易产生高血凝状态、高血压、水肿等副反应, 并增加乳腺癌及子宫内膜癌的发病危险。很多雌性激素替代药物的原料是主要从马体内提取而来。近年来, 经过大量研究, 发现植物中存在一类结构与动物雌激素类似的天然化合物, 它们的化学结构与人体内源性雌激素相似, 可与人体内雌激素受体结合, 但其活性较人类雌激素弱, 有雌激素和抗雌激素双重效应, 发挥何种效应取决于内源性雌激素的量和种类和数量。由于植物雌激素的雌激素样作用和较低的致癌风险, 在更年期妇女综合症的替代治疗中显示出一定的优越性, 这一结果引起了人们的广泛关注, 植物雌激素的相关研究也成为生命学科的一个热点。目前, 已发现的植物性雌激素有将近 400 种, 其中大豆异黄酮以其绿色、天然、毒副作用小和效果显著而备受广大科研工作者和消费者的推崇。

1 植物雌激素的研究概述

1.1 植物雌激素的来源、种类及化学结构

植物雌激素 (Phytoestrogens, PE) 是指提取自天然植物中、以苯基苯并吡喃酮为母体的多羟基酚类物质^[1-2], 由于其结构与动物雌二醇相似, 故称为植物雌激素。依据分子结构的不同主要包括3 类: 异黄酮类 (isoflavones)、木质素类 (lignans) 和香豆素类 (coumestans)。一种植物往往含有多种植物雌激素类化合物。其中异黄酮类化合物几乎在所有豆类中都存在, 如大豆、红三叶草、野葛等豆科植物, 尤其以大豆、黄豆、豌豆含量最高^[3-4]; 异黄酮类中研究较多的是染料木素和大豆素^[5], 工业加工的豆制品, 如豆腐、豆浆、酸乳酪、豆面及黄豆酱油中异黄酮含量减少^[6-7]。木质素类: 包括肠内脂和肠二醇, 广泛地存在于油籽、谷粒、水果和蔬菜中, 以亚麻籽中含量最高^[4,8,9], 在整株谷物、蔬菜、水果中含量较少^[10-11]; 香豆素类主要存在于处于发芽阶段的植物中, 如豆芽和草料作物等^[10]。目前植物雌激素的研究仍以异黄酮为主, 尤其是对大豆素和染料木素的研

究最为深入。主要的植物雌激素成分及其来源如表1所示。

表1 主要植物雌激素的种类及来源

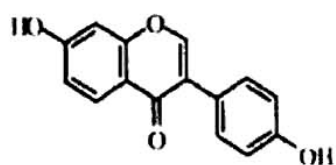
Table 1 Kinds and sources of phytoestrogens

种子	有活性的主要化合物	食物来源
异黄酮 Isoflavone	5,7,4'-三羟基异黄酮 (Genistein)	豆类：黄豆, 扁豆, 大豆, 菜豆, 蚕豆, 豌豆 豆制品：大豆粉, 豆面, 豆腐, 豆奶, 豆沙
	7,4'-二羟基异黄酮 (Daidzein)	
	鸡豆黄素A (Biochanin)	
	7-羟基-4甲氧基异黄酮 Formononetin	
	牛尿酚(Equol)	
木质素 Lignans	Enterodiol Enterolactone	谷类作物：小麦, 麦苗, 大麦, 蛇麻草, 燕麦, 麸糠, 大米, 黑麦 水果、蔬菜、种子：樱桃, 苹果, 梨, 核果, 亚麻 子油, 向日葵, 萝卜, 茴香, 洋葱, 橄榄油 酒制品：啤酒, 波旁酒(一种威士忌酒)
香豆素 Coumestants		豆芽：紫花苜蓿, 黄豆芽 草料作物：苜蓿
二羟基苯甲 酸内酯 Resorcylic acid lactones	玉米烯酮 (Zearalenone) Zearalenol	
其它	根皮素(Phloretin) 白藜芦醇(Resveratrol)	葡萄, 葡萄皮, 药用植物, 葡萄酒

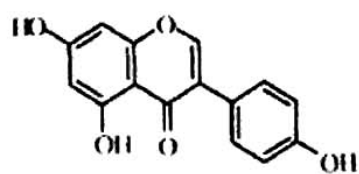
1.2 植物雌激素的结构及其特点

以大豆异黄酮为主的植物雌激素（主要活性组分为染料木素和大豆苷元）的化学结构和哺乳动物体内甾体类雌激素(如 17β -雌二醇)的结构十分相似^[1], 都具有雌激素的活性基团二酚羟基, 它可与生物体内雌激素受体(ER)结合而表现出一定的雌激素功能^[12](图1)。但由于大豆异黄酮活性组分与ER的结合力是甾体雌激素与ER的结合力的 $1/1000\sim 1/30000$, 使其具有雌激素双向调节作用特点: 即雌激素样作用和抗雌激素样作用^[13]。植物雌激素缺乏亲脂性基团, 这是影响物雌激素与其受体的亲和力^[14]的主要原因之一。构效关系可以为植物雌激素的这种双向调节作用提供一定的分子基础^[15]

异黄酮类

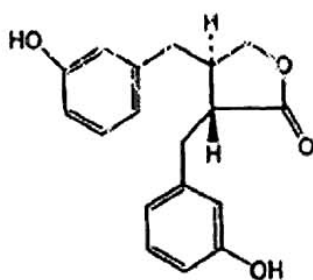


大豆甙元(daidzein, DDZ)

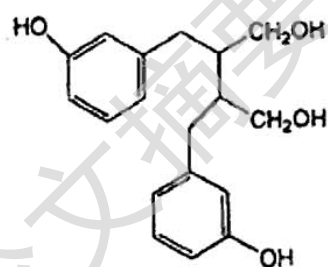


染料木黄酮(genistein, GST)

木酚素类

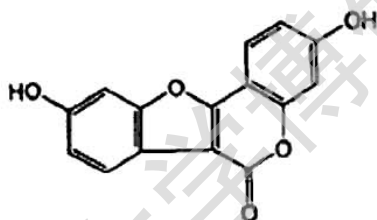


肠内脂(enterolactone)



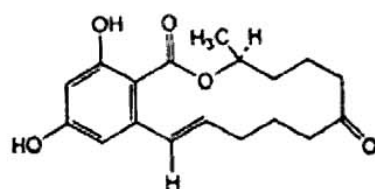
肠二醇(enterodiol)

香豆素类



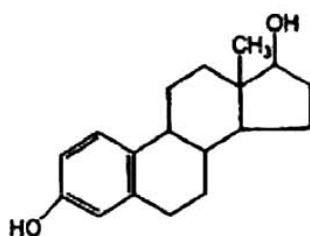
香豆雌酚(coumestrol)

真菌类



玉米烯酮(zearalenone)

内源性雌激素



雌二醇(17β-estradiol)

图1 代表性植物雌激素与内源性雌激素的化学结构式比较

Fig1 Structure compare between representative phytoestrogens and estrogen

1.3 植物雌激素的代谢

植物雌激素多以无活性的糖甙形式存在于植物中,经膳食摄入的体内的植物雌激素,在肠道经细菌糖苷酶的水解作用,转化为具有生物活性并易于吸收的分子如金雀异黄素等^[2],并被肠粘膜吸收入血。异黄酮在血循环中主要与血清白蛋白结合,小部分呈游离状态溶于脂蛋白中。大部分异黄酮在肝内与葡萄糖醛酸结合转化为水溶性物质,其余以硫酸酯或硫酸葡萄糖配形式排入尿液和粪便^[16-17]。然而,即使摄入等量的异黄酮或木质素,不同植物雌激素代谢物的浓度在不同的个体之间的差异仍然很大。因为饮食中植物雌激素的新陈代谢主要由胃肠道菌群、抗生素的使用和肠道疾病来决定^[18-20]。另外,纤维素、蔬菜和水果的过量摄入^[21-23]以及饮食中的脂肪、蛋白质、酒精和微量元素^[24-27]对雌激素的代谢会产生很大的影响,使其代谢表现出明显的性别差异和个体差异。

1.4 植物雌激素与雌激素受体

雌激素的生物学作用是通过基因组机制和非基因组机制实现的。雌激素与受体(estrogen receptor, ER)的结合,启动基因转录和特殊蛋白质的合成来发挥其基因组效应;非基因组效应可能与雌激素对细胞膜的直接作用和细胞膜受体有关。目前发现的雌激素受体有 α (ER α)受体和 β 受体(ER β)两个亚型。ER α 在大鼠的子宫、睾丸、垂体、卵巢、肾脏、附睾和肾上腺表达水平较高。ER α 的发现为研究雌激素的生物学作用产生了很大的促进作用。直到1996年,Kuiper等^[28]等在大鼠的前列腺和卵巢中克隆出ER β 。另外在大鼠肺、大脑、骨、子宫、睾丸、血管内皮也发现了ER β ^[29-31]。植物雌激素均具有酚环,在人体内可与两种雌激素受体结合,但植物雌激素与ER的亲和力远低于内源性雌激素,且对两种受体亚型的亲和力有差异,与17 β -雌二醇相比,金雀异黄素对ER α 的亲和力为4%,而对ER β 的亲和力为87%^[32]。由于ER α 和ER β 在不同组织和细胞的表达不同,因而植物雌激素与内源性雌激素雌二醇有着不同的组织特异性而发挥不同的作用^[33]。在泌尿生殖道均可检测到ER α 和ER β 的mRNA及其蛋白质^[34],但输卵管、子宫、阴道上皮以表达ER α 为主,ER β 表达微弱,而卵巢和血管平滑肌细胞以表达ER β 为主^[35]。同时植物雌激素也可与雌二醇竞争性结合ER产生雌激素拮抗作用,故具有双向调节作用,而且这种调节作用取决于其剂量及机体的内源性雌激素状态及雌激素受体的数量和类型(见前植物雌激素结构部分)。一方面,当体内

缺乏雌激素时，异黄酮与空乏的雌激素受体结合，从而起到模拟雌激素的生理生化作用，达到“补充雌激素”的目的，表现为异黄酮的类雌激素样的作用；另一方面，当体内雌激素水平过高时，异黄酮对雌激素有拮抗作用。从理论上讲，如果雌激素的感受器位置已经被较弱的植物雌激素占据，那么，更具潜能的雌激素就不能再被结合，由于异黄酮的“占位效应”，即异黄酮与雌二醇竞争结合雌激素的感受器，使得雌二醇不能产生激素效应，进而避免雌激素对靶细胞的过度刺激，有助于体内的雌激素保持一个平衡、合理、安全的作用水平。

1.5 植物雌激素的作用

被吸收的大豆异黄酮活性组分具有多种生理作用，对此已有较多的文献报道，概括起来主要有以下几个方面：

1) 雌激素样作用或雌激素/抗雌激素样双相作用^[36-37]

植物雌激素在体内外表现出弱的雌激素和抗雌激素活性。早在1946年报道的澳大利亚绵羊“三叶草病”生殖失调，是首次观察到的植物雌激素的雌激素作用。异黄酮能刺激实验动物子宫肥大，表现出雌激素作用。给动物模型雌二醇时，染料木素则起抗雌激素作用，降低子宫对雌二醇的摄取。体外实验已证实，染料木素对人体细胞系有增生(雌激素)和抗增生(抗雌激素)作用，且这种双相作用主要取决于植物雌激素在细胞培养液中的浓度。对于ER阳性的MCF27乳腺癌细胞，低浓度($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$)的染料木素，表现出雌激素作用，而高浓度($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)时则表现出抗雌激素作用。染料木黄酮、黄豆苷原、雌马酚和肠内酯的类似雌激素作用是由ER介导的，其标志是刺激肽合成酶2(PS2) mRNA的表达；而抗雌激素作用并不由ER介导，因为在ER阴性细胞中仍然表现出抗增生作用。

2) 对心血管系统的保护作用

植物雌激素对心血管系统具有保护作用^[38]，Sirtori等通过流行病学调查发现，长期摄食大豆制品能延缓动脉粥样硬化的发生，能有效预防心血管疾病。其作用机理主要有：大豆异黄酮可使低密度脂蛋白(LDL)受体上调，增加LDL受体活性，加速胆固醇清除，抗血栓的形成。染料木素通过抑制酪氨酸激酶阻断血小板源性生长因子生成，从而抑制凝血酶诱导的血小板激活和凝聚。通过抑制作用，减少了全身与动脉粥样硬化有关的血栓的形成。大豆异黄酮可以减少血浆中总胆

固醇和LDL的浓度,促进甲状腺素分泌,促进胆酸的排泄以及雌激素样作用^[39-40]。

3) 抗氧化作用

大豆异黄酮具有较强的抗氧化作用。大豆异黄酮可使血液和组织中的抗氧化酶活性增强、脂质过氧化物水平下降。其作用机理可能是由于大豆异黄酮抑制脂质过氧化、抑制活性氧(ROS)的生成、对促癌剂 TPA 和 PMA 诱导肿瘤细胞产生的过氧化氢有明显的抑制效应,还能抑制由 Fentoa 反应或紫外线照射引起的 DNA 氧化产生 8-OHNG,防止 DNA 分子发生突变^[41-42]。

4) 抗肿瘤作用

与欧美国家相比,东亚国家的乳腺癌以及前列腺癌病死率相对较低,特别是中国、日本等以大豆为主要食物的亚洲国家,激素依赖性疾病发病率较低。研究人员对此疾病发病率的差异进行了病因学调查,其结果令人振奋。各种癌症,包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌以及肺癌等发病率都与大豆的摄取呈负相关性。大豆异黄酮抗癌的作用机制主要有以下几个方面:类似于女性雌激素作用以及抗雌激素的作用。能抑制与癌相关酶的活性作用,特别是酪氨酸激酶。在癌细胞增殖的阶段具有抑制血管增生的作用。可以消除活性氧,从而具有抗氧化作用,调节细胞周期。染料木素具有抑制一些与 DNA 切断有关酶活性的作用。目前普遍认为单独服用异黄酮或配合化疗可能是一种有效的抗癌方法^[43]。

5) 防治骨质疏松的作用

随着年龄的增长,女性体内雌激素分泌减少,其防止骨骼钙质溶出的作用减弱,造成钙质流失,形成骨质疏松,若能及时补充一定量的大豆异黄酮,则可缓解骨质疏松症状。日本学者以去卵巢的大白鼠模拟雌激素缺乏体系进行异黄酮饲喂实验,结果发现,饲喂含大豆异黄酮的大鼠,其大腿骨密度和断裂应力明显高于对照组,说明大豆异黄酮在预防骨质疏松上与雌激素有同功作用^[44]。对大豆异黄酮预防骨质疏松机制的研究认为,大豆异黄酮起到雌激素增强效应,即通过替代甾体雌激素与ER结合,减少肠道中游离ER的生成,从而减轻ER对钙质吸收的抑制作用^[45]。Potter 等^[46]对66名绝经期妇女骨密度变化的研究中发现,植物雌激素可使腰椎骨密度有显著性的升高。妇女分别服用含56、90mg异黄酮的豆类蛋白、以及作为对照的酪蛋白和脱脂奶粉,连续服用24周,采用双能X线吸收法测定脊柱骨密度,结果与对照组相比,服用含异黄酮90mg的豆类蛋白组妇女在脊椎第

L1-L4 节骨密度及骨矿物质含量有显著性升高(2%)。异黄酮主要结合于骨组织中雌激素 β 受体,通过抑制破骨细胞活性和骨吸收过程,维持成骨细胞和破骨细胞间的动态平衡,从而有效地防止骨质疏松。

2 植物组织培养和悬浮培养的研究

2.1 研究概况

植物组织培养(Plant tissue culture)是20世纪发展起来的一项新兴生物技术,是现代生物工程的基础,是遗传转化、植物物种改良研究的基本环节之一^[47]。植物组织培养是指在无菌条件下,将离体的植物器官(根、茎、叶、花、果实和种子等)、组织(如花药组织、形成层、胚乳和皮层等)、细胞(体细胞和性细胞)以及原生质体培养在人工配制的培养基上,给予适当的培养条件使其长成完整植株的过程^[48]。

大豆的组织培养研究始于20世纪60年代,各种外植体的组织培养与再生植株都十分困难,直到进入80年代中、后期,大豆的组织培养工作才有了突破性的进展。常用的外植体有真叶、下胚轴、子叶、子叶节、胚轴和胚等。实验发现,MS培养基较适合于大豆细胞培养。研究内容主要集中在基因型、培养基、激素和外植体种类等对芽形成的影响,培养基以MS或B5基本培养基为多,植物激素主要有6BA、NAA、IBA和IAA等。以未成熟胚^[49-50]、真叶^[51-54]、下胚轴^[55-59]、成熟子叶^[60-61]、子叶节^[62-66]分别为外植体,诱导出了愈伤组织。对大豆子叶、叶、茎和胚轴做组织培养,发现在大豆不同组织离体培养中,子叶和下胚轴的愈伤组织产生较快^[67]。Christianson(1983)^[68]指出幼胚最适宜长成植株,而且大豆组织增殖要求高盐培养基,认为MS为基本培养基更适宜。1989罗希明等^[69]用MS诱导出大豆愈伤组织,并将其分生能力强的部分转入MS液体培养基中,振荡培养,每隔14d分别用100和300目尼龙网过滤,得到大量悬浮培养的单细胞。

2.2 植物组织和悬浮细胞培养在次生代谢物积累方面的研究

与整株植物栽培(例如中草药的人工种植)相比,利用植物组织(细胞)培养生产次生代谢产物(即价值较高的天然产物)具有很多优点,主要包括以下几个方面:

(1) 培养体系的细胞代谢速率高于分化了的完整植株,特定的培养条件也能诱导并加速细胞的分生和生长,缩短了代谢合成周期,通过优化培养基、培养条件和选择优良细胞系的方法可以得到含量高于整株植物栽培的次生代谢产物极大

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库